

PCT/EP03/11354



REC'D 27 NOV 2003	
WIPO	PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 102 47 790.6

Anmeldetag: 14. Oktober 2002

Anmelder/Inhaber: chemogenix GmbH, Pleiskirchen/DE

Bezeichnung: Verfahren zur Herstellung von
Oligonukleotidkonjugaten

IPC: C 07 H 21/00

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der
ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 20. Oktober 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag


Wehner

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON OLIGONUKLEOTIDKONJUGATEN

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur festphasengestützten Herstellung von Oligonukleotidkonjugaten, umfassend das Umsetzen eines 3'-5' oder eines 5'-3' aufgebauten Oligonukleotids dessen terminale OH-Gruppen mit labilen Schutzgruppen versehen sind, die gleich oder verschieden sein können, mit einer Markierungsverbindung, die einen Teil einer labilen Schutzgruppe nukleophil substituieren kann.

Synthetische Oligonukleotide finden Anwendung in allen Bereichen der Gentechnik, wie beispielsweise bei der Gentransfektion oder der Genanalyse. Polynukleotide werden durch Kettenverlängerung einer Ausgangsverbindung mit vielen einzelnen Nukleosidbausteinen hergestellt. Zur Synthese werden die miteinander reagierenden Hydroxygruppen so derivatisiert, dass zwischen den einzelnen Nukleosidbausteinen eine Phosphodi- oder Phosphotriestergruppe oder eine H-Phosphonatgruppe bei der Umsetzung gebildet wird. Weitere, diese Umsetzung störende funktionelle Gruppen der Ausgangsverbindungen werden mit dafür üblichen Schutzgruppen versehen.

Beispielsweise beschreiben die DE 199 15 867 A1 und die DE 199 38 092 A1 photolabile Schutzgruppen für Hydroxygruppen, die mit hohen Ausbeuten in ein Nukleosid oder in ein Nukleotid eingeführt werden können und die bei Zufuhr elektromagnetischer Strahlung im UV/VIS Bereich die geschützte Hydroxygruppe wieder freisetzen.

Zur besseren Verfahrenseffizienz werden Oligo- und Polynukleotide heutzutage meist über Festphasen-Syntheseverfahren hergestellt. Die Ausgangsverbindungen werden direkt oder über Linker an funktionalisierte Feststoffoberflächen von Polymerkügelchen oder Glas-, Metall- oder Kunststoffoberflächen gebunden und mit den zur Polynukleotidkettenverlängerung notwendigen Reagenzien umgesetzt. Überschüssige

Reagenzien sowie lösliche Reaktionsnebenprodukte und Lösungsmittel können leicht von den festphasengebundenen Polynukleotidverbindungen entfernt werden.

Häufig werden derart hergestellte Oligonukleotide während der eigentlichen Synthese in nachgeschalteten Reaktionsschritten weiter funktionalisiert (beispielsweise mit einem Hapten versehen), um in molekularbiologischen oder biochemischen Reaktionen einen entsprechenden Einsatz zu ermöglichen. Der Begriff "Hapten" bezeichnet eine von einem Oligonukleotid verschiedene Spezies, die die physikalischen, chemischen und biologischen Eigenschaften des mit einem Hapten zu funktionalisierenden Oligonukleotids verändert.

Meist handelt es sich dabei um Modifikationen, die eine eindeutige Charakterisierung des Oligonukleotides im biologischen Assay ermöglichen, zum Beispiel durch direkt optische oder massenspektrometrische Methoden oder indirekte Detektion durch Sekundärnachweis über Antikörper. Jedoch ist es auch gebräuchlich, das Oligonukleotid mit Linkern, Adaptoren, Spacern und Ähnlichem zu funktionalisieren, um diese dann zum Beispiel selektiv an feste Oberflächen oder andere relevante Moleküle kovalent oder über andere Wechselwirkungen (Wasserstoffbrückenbindungen, van der Waals Kräften etc.) binden zu können. Gelegentlich kommen auch Moleküle zum Einsatz, die eine selektive Aufreinigung des Konjugates erlauben, später jedoch wieder vom eigentlichen Oligonukleotid abgespaltet werden. Eine sehr gute Übersicht über gängige Methoden ist zu finden in: *Methods in Molecular Biology 26: Protocols for Oligonucleotide Conjugates* (Sudir Agrawal, ed.) Humana Press, Totowa, New Jersey, 1994 (ISBN:0-89603-252-3)".

Häufig werden aus Zeitgründen Phosphitamidderivate der erwünschten Haptene eingesetzt, da solche Reagenzien in den üblichen DNA Syntheseautomaten einfach eingesetzt werden können und keine besondere Qualifikation des Operators erfordern. Außerdem sind die Produkte in der üblichen Weise aufzureinigen. Allerdings wird je Hapten je ein

Produkte in der üblichen Weise aufzureinigen. Allerdings wird je Hapten je ein spezifisches Reagenz benötigt, das im Vergleich zum Basishapten sehr teuer, häufig relativ instabil und nur selten mit den erwarteten hohen Reaktionsausbeuten wie bei Standard DNA-Phosphitamiden zum Ziel führt. Produktreste, die immer dann anfallen, wenn nur
5 wenige Oligonukleotide mit einer spezifischen Markierung hergestellt werden sollen, müssen innerhalb kürzester Zeit verworfen werden, was weiter zur schlechten Wirtschaftlichkeit dieser Reagenzien beiträgt. So werden die Kosten von modifizierten Oligonukleotiden heute weitgehend vom Kostenanteil der Funktionalisierungsreagenzien bestimmt.

10

Der vorliegenden Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde, ein kostengünstiges und universell verwendbares Verfahren zur Verfügung zu stellen, Haptene in Oligonukleotide einzuführen, ohne die Nachteile des Standes der Technik aufzuweisen. Insbesondere soll dem wenig qualifizierten Nutzer ermöglicht werden, unter Verwendung eines universell
15 einsetzbaren DNA-Bausteins unterschiedliche kommerziell leicht verfügbare und kostengünstige Haptene an Oligonukleotide koppeln zu können, ohne dass Produktreste verworfen werden müssen.

20

Diese Aufgabe wird durch ein Verfahren zur Herstellung von Oligonukleotidkonjugaten gelöst, wobei das erfindungsgemäße Verfahren das Umsetzen eines 3'-5' oder eines 5'-3' aufgebauten Oligonukleotids, bei dem eine terminale OH-Gruppe mit einer labilen Schutzgruppe versehen ist, die gleich oder verschieden sein können, mit einer Markierungsverbindung, die einen Teil einer labilen Schutzgruppe nukleophil substituieren kann umfaßt.

25

Dieses Verfahren ermöglicht den einfachen Zugang zu thermodynamisch und kinetisch stabilen Oligonukleotidkonjugaten. Diese Bausteine können in allen bekannten Verfahren

zur Herstellung von Oligo- bzw. Polynukleotiden einfach und ohne großen synthetischen Aufwand als vorgefertigte Bausteine eingesetzt werden.

Unter dem Begriff „Konjugat“ werden Moleküle verstanden, die aus mindestens zwei
5 unterschiedlichen Bausteinen mit unterschiedlichen physikalischen, chemischen, biologischen Eigenschaften bestehen. Beispielsweise kann ein Baustein extrem lipophil und der andere extrem hydrophil sein. Unter dem Begriff „Oligonukleotidkonjugat“ wird daher vorliegend verstanden, daß ein Teil des Moleküls aus einem Oligonukleotid besteht, d.h. einem Oligonukleotid mit mindestens zwei über einen Phosphorester miteinander
10 verknüpften Nukleosidbausteinen. Der Phosphorester kann dabei auch geschützt oder ungeschützt vorliegen. Für das erfindungsgemäße Verfahren spielt es jedoch keine Rolle), ob der Phosphorester als Phosphordi- oder -triester oder sogar als H-Phosphonat vorliegt. Das Oligonukleotid kann dabei entweder in 3'-5' Richtung, oder aber auch in 5'-3' Richtung aufgebaut sein. Die Basen der Nukleoside können dabei geschützt oder ungeschützt
15 vorliegen, wobei allerdings geschützte Basen bevorzugt sind.

Bevorzugt finden in den erfindungsgemäßen Verfahren als Oligonukleotide solche Oligo- und Polynukleotide aufgebaut aus mindestens 8 bis zu 100 Nukleosiden, insbesondere bis zu 70 Nukleosiden, vorzugsweise bis zu 30 Nukleosiden, besonders bevorzugt bis zu 25
20 Nukleosiden und ganz besonders bevorzugt bis zu 20 Nukleosiden Verwendung.

Vorteilhafterweise weist die Markierungsverbindung eine von dem Oligonukleotid verschiedene chemische und/oder physikalische Eigenschaft auf.

25 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ermöglicht die chemische und/oder physikalische Eigenschaft nach erfolgter Umsetzung eine Identifizierung des Reaktionsproduktes. Dies vereinfacht die Aufreinigung nach erfolgter Synthese und dient

gleichzeitig der genauen Identifizierung der gewünschten Oligonukleotide, beispielsweise auf Spots auf der Oberfläche sogenannter Biochips (DNA Chips). Derartige Eigenschaften umfassen, sind aber nicht beschränkt auf, Fluoreszenz, Phosphoreszenz, Lumineszenz, erhöhte und spezifische UV/VIS, IR Absorption, massenspektrometrisch spezifische Erfassbarkeit oder Affinität zu sekundären Identifikationsmechanismen wie z.B. Antikörper, farbige oder fluoreszierende Nanopartikel, molekulare Barcodes und dergleichen mehr. Auch der Einsatz von Fluoreszenzlöschern wie z.B. von Dinitrophenolen ist möglich.

Insbesondere enthält die Markierungsverbindung eine Gruppe, die ausgewählt ist aus SH, OH, NRH, wobei die NRH Gruppe Bestandteil eines homo- oder heterocyclischen oder homo- oder heteroaromatischen Systems sein kann und wobei R = H, Alkyl, substituiertes oder unsubstituiertes Cycloalkyl, substituiertes oder unsubstituiertes Aryl, substituiertes oder unsubstituiertes Alkylaryl sein kann.

Geeignete Markierungsverbindungen (Label, Hapten) umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf Peptide, Proteine, Silikone, Biotin, Hydrazide, Lipide, Steroide, mehrkernige aromatische bzw. heteroaromatische Systeme wie Naphthaline, Anthracene, Xanthone, Thioxanthone, Acridone und deren entsprechend substituierte Derivate sowie Dinitrophenole, Azobenzole, Psoralene, Fluoresceine, Acridine, Thiazole, Cyanine, Coumarine und deren entsprechend substituierte Derivate. Als weitere Markierungsverbindungen kommen mono-, bi- oder polyfunktionelle langkettige oder verzweigte Alkane, Dendrimere, Alkoxyalkylverbindungen und insbesondere Polyethylenglykole zum Einsatz.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird das Oligonukleotidkonjugat teilweise geschützt.

In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird das Oligonukleotidkonjugat vollständig geschützt.

- 5 Vorteilhafterweise findet das Oligonukleotidkonjugat erhältlich nach dem erfindungsgemäßen Verfahren Verwendung für molekularbiologische und biochemische Assays. Die stabilen und besonders einfach und in hoher Reinheit erhältlichen Konjugate lassen sich einfach und ohne besondere Vorkehrungen lagern und erst im Moment des Assays, ohne besondere aufwendige Maßnahmen zu treffen, dem Reaktionsgemisch
10 hinzugeben.

- Als besonders vorteilhaft hat sich überraschenderweise herausgestellt, dass die mit einer labilen Schutzgruppe versehenen Nukleosidphosphitamid-Synthone mindestens genau so stabil wie herkömmliche bei der DNA Synthese eingesetzte Phosphitamide sind, und zwar
15 sowohl in Substanz als auch in Lösung während deren Einsatz in DNA Syntheseautomaten. Des Weiteren sind die erzielbaren Kopplungsausbeuten ohne jede Modifikation der Synthesebedingungen vergleichbar mit denen der normalen Phosphitamide. Außerdem ist die Herstellung der Synthone vergleichsweise einfach und kostengünstig, so dass diese Reagenzien im Preis nur unerheblich um ca. einen Faktor 2
20 über dem gewohnten liegen, während z. B. Biotinphosphitamid im Vergleich zu Biotinhydrazid um einen Faktor 5 teurer ist, Fluoresceinphosphitamid im Vergleich zu Fluoresceinamin um einen Faktor 35 und Hexaethylglykolphosphitamid im Vergleich zu Hexaethylglykol gar um einen Faktor 100.

- 25 Überraschend ist auch die hohe Reaktionsgeschwindigkeit der nukleophilen Substitution, die im Falle des Nitrophenylcarbonates für Amine bei Raumtemperatur innerhalb einer bis zwei Minuten, für primäre Alkohole unter DMAP Katalyse innerhalb 5 bis 10 Minuten

nahezu quantitative Umsetzungen ermöglicht. Dies ist für den Anwender besonders vorteilhaft, da sich unter Ausnutzung der einfachen Aufreinigung durch Filtration am DNA Syntheseautomaten ein hoher Durchsatz bei geringem Aufwand ergibt. Zusätzlich kann beim NPC Derivat die Austrittsgruppe Nitrophenylat zur Abschätzung der
5 Reaktionsausbeute spektrophotometrisch bestimmt werden.

Besonders vorteilhaft ist es außerdem für Anwender, dass unter Verwendung der erfindungsgemäßen Synthone sehr einfach Oligonukleotidkonjugate herstellbar sind, für die noch keine kommerziellen Angebote existieren. Dies wird in den nachstehenden Ausführungsbeispielen im Falle von N-Methylaminopropyl-Trimethoxysilan und Pyrenmethanol besonders deutlich.
10

Es versteht sich, dass die erfindungsgemäße Methode auch für die Herstellung von Oligonukleotidkonjugaten geeignet ist, wenn das Oligonukleotid selbst ein modifiziertes Oligonukleotid ist, z.B. RNA, PNA, LNA, Alkanphosphonat-DNA und deren Derivate
15 sowie Mischungen daraus.

Eine weiterer vorteilhafter Aspekt der Erfindung betrifft ein Kit umfassend ein 3'-5' oder eine 5'-3' aufgebautes Oligonukleotid und eine Markierungsverbindung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens.
20

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung betrifft ein Kit, umfassend ein Oligonukleotidkonjugat erhältlich nach dem erfindungsgemäßen Verfahren.

Bevorzugt ist weiter, wenn das Kit ein Oligonukleotidkonjugat erhältlich nach dem erfindungsgemäßen Verfahren, ein weiteres Oligonukleotidderivat und/oder Lösungsmittel
25

und/oder eine Arbeitsanweisung zur Durchführung eines festphasengestützten Verfahrens zur Herstellung von Oligo- und/oder Polynukleotiden in einer räumlichen Einheit enthält.

Vorteilhafte Ausgestaltungen der Erfindung werden weiter in den Zeichnungen erläutert.

5 Hierbei zeigen:

Fig. 1 ein beispielhaftes nicht einschränkendes Syntheschema zur Herstellung von Oligonukleotidkonjugaten.

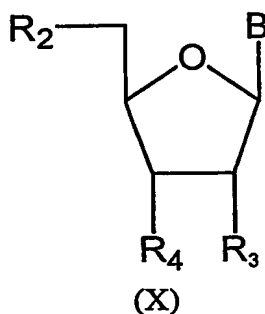
10 Figur 1 zeigt ein beispielhaftes nicht einschränkendes Syntheschema zur Herstellung von Oligonukleotidkonjugaten (3) gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren.

Dabei wird ein festphasengebundenes mit wie nachstehend definierten Schutzgruppen P versehenes Oligonukleotid (1) mit einer Verbindung Label-NH₂ (2) umgesetzt. Die feste
15 Phase kann dabei ein beliebiges, in der Oligonukleotidchemie übliches Substrat sein. Das Substrat ist in Figur 1 mit dem Buchstaben S dargestellt, wobei das Oligonukleotid (1) an das Substrat S beispielsweise kovalent gebunden ist oder aber über in der Oligonukleotidchemie gängige Mechanismen gebunden bzw. befestigt ist. Zwischen Oligonukleotid und Substrat S können auch übliche Linker und Spacergruppen angeordnet
20 sein.

Der Begriff „Label“ (auch als "Hapten" bezeichnet) bedeutet in diesem Zusammenhang einen Molekülrest, der Peptide, Proteine, Silikone, Biotin, Hydrazide, mehrkernige aromatische bzw. heteroaromatische Systeme wie Naphthalin, Anthracen, Xanthone,
25 Thioxanthone, Acridon und deren entsprechend substituierte Derivate sowie Alkyl oder Alkoxyalkylketten wie z.B. Polyethylenglykole umfasst, darauf jedoch nicht beschränkt ist.

Natürlich können anstelle von NH_2 auch andere vorstehend erwähnte reaktive Gruppen verwendet werden, wie z. B. $-\text{SH}$, $-\text{OH}$ und $-\text{NRH}$.

Das Oligonukleotid (1) umfasst mindestens zwei über einen Phosphorester miteinander verbundene Nukleoside ($n = 1$), von denen eines beispielsweise ein Nukleosid gemäß der Formel (X) ist und das endständige Nukleosid die in Verbindung (1) dargestellte Bedeutung hat, und die sowohl über über 3'-5'-Phosphorsäureesterbindungen oder über 5'-3'-Phosphorsäureesterbindungen verbunden sein können:



wobei in Verbindung (X) und im endständigen Nukleosid der Buchstabe B für Adeniny, Cytosiny, Guaniny, Thyminy, Uracily, 2,6-Diaminopurin-9-yl, Hypoxanthin-9-yl, 5-Methylcytosin-1-yl, 5-Amino-4-carboxylimidazol-1-yl oder 5-Amino-4-carbamoylimidazol-1-yl steht, wobei die primären Aminofunktionen von B eine in der Oligonukleotidchemie übliche permanente Schutzgruppe P aufweisen bzw. Thyminy oder Uracily an der O_4 -Position eine in der Oligonukleotidchemie übliche permanente Schutzgruppe P aufweisen,

R_2 ein Phosphorsäureesterrest, eine freie Hydroxygruppe, ein Phosphitamidoester, ein Phosphonsäureesterrest oder eine sonstige geeignete Hydroxyschutzgruppe sein kann,

R_3 ein H, OH, Halogen, Acylamino-, Alkoxy- oder Alkoxyalkylrest mit 1 bis 4 C-Atomen sein kann,

R_4 ein Phosphorsäureesterrest, eine freie Hydroxygruppe, ein Phosphitamidoesterrest, ein
5 Phosphorsäureesterrest, ein H-Phosphonatrest oder eine Hydroxyschutzgruppe sein kann,

und wobei in Formel (1) das Motiv L-Y eine in der Oligonukleotidchemie übliche Abgangsgruppe ist, wobei Y = O, Methyl, Ethyl oder Propyl ist,

10 X = O, S, Se oder Te bedeutet

und n eine ganze Zahl von 1 bis 10 sein kann, wobei n = 1 bis 4 bevorzugt ist.

Der Begriff "Nukleotid" in Verbindung (1) bedeutet ein wie vorstehend definiertes Nukleosid, das an seiner 5' Stellung einen Phosphorrest gemäß der Definition von R_2
15 enthält. Der Buchstabe P hat ebenfalls die vorstehend definierte Bedeutung.

Verbindung (1) ist über dem Fachmann bekannte Verfahren der Oligonukleotidsynthesechemie einfach zugänglich. Natürlich sind auch andere beliebige Oligonukleotide im Rahmen der Erfindung einsetzbar.

20

Verbindung (2) substituiert in Schritt I nukleophil die Abgangsgruppe L-Y und es entsteht Verbindung (3), wobei überschüssiges Label-NH₂ und L-Y in einfacher Weise durch Filtration entfernt werden. Verbindung (3) wird nachfolgend im Verfahrensschritt II mit Hilfe üblicher, dem Fachmann bekannter Mittel entschützt und es wird ein entschütztes,
25 lagerfähiges und extrem stabiles Oligonukleotidkonjugat (4) erhalten. Je nach verwendeten Schutzgruppen und Reaktionsbedingungen ist auch nur eine teilweise Entschützung, das heißt, entweder nur der Base B oder nur des Nukleotidrestes möglich.

Im Folgenden wird die Erfindung anhand von Beispielen erläutert. Diese Beispiele dienen lediglich der Erläuterung der Erfindung und schränken den allgemeinen Erfindungsgedanken in keiner Weise ein.

5

Abkürzungen

DMT	Dimethoxytrityl
NPC	4-Nitrophenyloxycarbonyl
10 TAC	tert. Butylphenoxyacetyl
RT	Retentionszeit
TEAAC	Triethylammoniumacetat
ACN	Acetonitril
DMAP	4-Dimethylaminopyridin

15

Ausführungsbeispiele

Ausführungsbeispiel 1

20 Zwei Oligonukleotide wurden auf einem automatisierten DNA Synthesizer (Applied Biosystems Modell 392) mit den folgenden Sequenzen synthetisiert:

Oligonukleotid 1:

5'-d(TGC TCG CTG T)-3',

25 Oligonukleotid 2:

5'-d([NPC-T] GC TCG CTG T)-3',

Als Synthone wurden für die Synthese im Falle von C und G Standard β -Cyanoethyl-diisopropylamino-phosphoramidite von Perseptive Biosystems mit TAC als Basenschutzgruppe und DMT als 5' Schutzgruppe eingesetzt. Im Fall des Oligonukleotids 2 war das letzte eingeführte T das β -Cyanoethyl-diisopropylamino-phosphoramidit von T mit einer 5'-p-Nitrophenylcarbonat Funktion [NPC-T-Amidit].

Im Falle der Verwendung der DMT geschützten Synthone wurde mit dem Synthesizer die durchschnittliche Kopplungsausbeute pro Syntheseschritt als größer 98% ermittelt.

10 Der Synthesemaßstab war 0,4 mikromolar und es wurde ein vom Hersteller empfohlenes Standardsyntheseprogramm durchgeführt.

Ergebnisse:

15 Oligomer 1:

Im Falle der Synthese des Oligomers 1 wurde die Synthese als „Trityl-off“ und mit manueller Entschützung mit Ammoniak durchgeführt und ergab das gewünschte Oligonukleotid in einer Reinheit von 98% (bestimmt über HPLC (RT=8,17 min)).

20 Oligomer 2:

Im Falle des Oligomers 2 wurde die Synthese als "Trityl-on" durchgeführt und der feste Träger wurde von der Synthes Säule entfernt und in drei in etwa gleich große Teile (2a, 2b, 2c) geteilt und in Eppendorf Reaktionsröhrchen transferiert.

25 Die einzelnen Teile 2a, 2b, 2c wurden anschließend wie folgt behandelt:

2a: Reaktion über 15 Minuten mit einer Anthracen-Vorratslösung (10 µl) in 90 µl Acetonitril unter gelegentlichem Schütteln, anschließend wurden 200 µl konzentrierter Ammoniak zugegeben und die Lösung bei Raumtemperatur über Nacht belassen, um die Basenschutzgruppen zu entfernen und das Oligonukleotidkonjugat vom Träger abzuspalten.

2b: Reaktion über 30 Minuten mit einer Anthracen-Vorratslösung (50 µl) in 50 µl Acetonitril unter gelegentlichem Schütteln, anschließend wurden 200 µl konzentrierter Ammoniak zugegeben und die Lösung bei Raumtemperatur über Nacht belassen, um die Basenschutzgruppen zu entfernen und das Oligonukleotidkonjugat vom Träger abzuspalten.

2c: Zugabe von 200 µl konzentriertem Ammoniak; die Lösung wurde bei Raumtemperatur über Nacht belassen, um die Basenschutzgruppen zu entfernen, das Oligonukleotidkonjugat vom Träger abzuspalten und das nicht derivatisierte NPC- in die freie OH-Funktion zurück zu überführen.

Die Anthracen-Vorratslösung (in Acetonitril) bestand aus 0,5 Mol N-Methyl(aminomethyl) Anthracen und 0,2 Mol Dimethylaminopyridin.

Anschließend wurde die überstehende Lösung in allen drei Beispielen 2a, 2b, 2c von dem Träger abdekantiert, mit Wasser gewaschen und die vereinten Lösungen zur Trockne in einem Speed-Vac-System, Savant SC 210, eingedampft. Nach Wiederauflösen des Rückstandes in einer Pufferlösung wurden die Beispiele 2a, 2b, 2c mittels HPLC analysiert und ergaben folgende Ergebnisse: (RT Werte sind in Minuten angegeben, Säulentyp RP-18 Merck Lichrosphere 125x4), Pumpentyp L-7100 (Merck-Hitachi), Lösungsmittel A:TEAAC, Lösungsmittel B,C: ACN)

Beispiel 2a: Ein DMAP-Peak erschien bei 2,37 Minuten, ein Nitrophenol-Peak bei 13 Minuten und ein Anthracen-Peak bei 29 Minuten, während die Nebenprodukte der Reaktion ebenso wie die nicht-reagierten Oligonukleotidsequenzen nach ungefähr 8 Minuten erschienen. Bei 15,8 Minuten erschien der Oligonukleotidkonjugat-Peak mit der an sein 5'-Ende gekoppelten Anthraceneinheit als Carbamat und kann aufgrund der intensiven Fluoreszenz dieses Peaks einfach bestimmt werden. Die Umsetzung erfolgte zu ungefähr 90%.

Beispiel 2b: Der DMAP-Peak erschien bei 2,13 Minuten, der Nitrophenol-Peak bei 13 Minuten und der Anthracen-Peak bei 29 Minuten, während die Nebenprodukte der Reaktion ebenso wie nicht-abreagierte Oligonukleotidsequenzen nach ungefähr 7 Minuten erschienen. Bei 15,8 Minuten erschien das Oligonukleotidkonjugat mit der an sein 5'-Ende gekoppelten Anthraceneinheit als Carbamat und kann aufgrund der Fluoreszenz dieses Peaks bestimmt werden. Die Umsetzung erfolgte zu mehr als 95%.

Beispiel 2c: Der Nitrophenol-Peak erschien bei 13 Minuten, die Nebenprodukte der Reaktion ebenso wie die nicht-reagierten Oligonukleotidsequenzen bei ungefähr 7 Minuten. Bei 8,17 Minuten erschien das Oligonukleotid, das die gleiche Sequenz wie das Oligonukleotid 1 aufwies. Die Identifikation erfolgte durch gleichzeitige Injektion beider Produkte (Oligonukleotid und Beispiel 2c), die denselben einzigen Peak ergaben. Die Umsetzung erfolgte zu mehr als 98%.

Diese Reaktion weist nach, dass nicht derivatisiertes NPC-Oligonukleotid, d.h. eine nicht mit einem Hapten umgesetzte NPC-Gruppe während der ammoniakalischen Schutzgruppenabspaltung/Totalentschüttung vollständig zu nicht derivatisiertem,

originärem OH-Oligonukleotid zurückreagiert und somit nicht in nachfolgenden Reaktions- oder Reinigungsschritten stört.

Ausführungsbeispiel 2

5

Das 5'-p-Nitrophenylcarbonat des Thymidins [NPC-T] wurde mit folgenden Verbindungen umgesetzt:

1. 2-(2-Nitrophenyl)propan-1-ol unter DMAP Katalyse in Dichlormethan
2. Pyrenylmethanol unter DMAP Katalyse in Dichlormethan
- 10 3. 4-Chlorophenylhydrazin mit 1,1 Äquivalenten DMAP in Dichlormethan
4. Acetylhydrazin in Dichlormethan
5. N-methyl-aminopropyltrimethoxysilan in DMF
6. Fluorenmethanol mit DMAP Katalyse in Toluol
7. Allylalkohol mit DMAP Katalyse in Dichlormethan
- 15 8. 2,2,2-Trichlorethanol mit DMAP Katalyse in Dichlormethan

Die Reaktionszeit betrug bei Raumtemperatur 5 - 60 Minuten, wobei etwa 1,2 Äquivalente Reaktionspartner bezogen auf NPC-T eingesetzt wurden.

20 Die Analyse der Reaktionsprodukte erfolgte über Dünnschichtchromatographie und zeigte jedes Mal eine erfolgte quantitative Umsetzung zum Carbamat bzw. zum Carbonat an. Die Reaktion konnte aufgrund der zunehmenden gelben Farbe aufgrund des freigesetzten Nitrophenolatanions leicht verfolgt werden.

25 Die Produkte der Reaktionen 1, 6, 7 und 8 ergaben Reaktionsprodukte, die identisch mit Vergleichsbeispielen waren, die durch direkte Reaktion mit den entsprechenden Chloroformiaten erhalten wurden.

Die Produkte der Reaktionen 2, 3 und 4 wurden über ihre NMR Spektren charakterisiert. Festzuhalten ist, dass das Produkt der Reaktion 2 nicht über das entsprechende Chloroformiat erhalten werden kann.

5

Das Produkt der Reaktion 5 konnte aufgrund seiner hydrolytischen Zersetzung und der gleichzeitigen Bildung von unlöslichen oligomeren Silikonen nicht gereinigt und isoliert werden. Wenn Proben aus der Reaktionsmischung in Reaktion 5 auf eine Silikadünnschichtchromatographieplatte gegeben wurden und für eine Minute erhitzt wurden, bevor versucht wurde, die Chromatographie zu entwickeln, war die Verbindung schon auf dem Silika immobilisiert, so dass selbst unter Verwendung einer sehr polaren mobilen Phase keine Migration der Reaktionsprodukte möglich war.

10

Damit ist das Reaktionsprodukt aus Reaktion 5 besonders gut zur Verankerung von Oligonukleotidsequenzen auf festen Trägern geeignet.

15

* * * * *

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur festphasengestützten Herstellung von Oligonukleotidkonjugaten,
5 umfassend das Umsetzen eines 3'-5' oder eines 5'-3' aufgebauten Oligonukleotids, bei dem die terminale OH-Gruppe mit einer labilen Schutzgruppe versehen ist, mit einer Markierungsverbindung, die einen Teil der labilen Schutzgruppe nucleophil substituiert.
- 10 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Markierungsverbindung eine von dem Oligonukleotid verschiedene chemische und/oder physikalische Eigenschaft aufweist.
- 15 3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die chemische und/oder physikalische Eigenschaft nach erfolgter Umsetzung eine Identifizierung des Reaktionsproduktes ermöglicht.
- 20 4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Markierungsverbindung eine reaktive Gruppe enthält, die ausgewählt ist aus SH, OH, NRH, wobei die NRH Gruppe Bestandteil eines homo- oder heterocyclischen oder homo- oder heteroaromatischen Systems sein kann und wobei R = H, Alkyl, substituiertes oder unsubstituiertes Cycloalkyl, substituiertes oder unsubstituiertes Aryl, substituiertes oder unsubstituiertes Alkylaryl ist.
- 25 5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Oligonukleotidkonjugat teilweise entschützt wird.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Oligonukleotidkonjugat vollständig geschützt wird.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Oligonukleotidkonjugaten, umfassend das festphasengestützte Umsetzen eines 3'- 5' oder eines 5'- 3' aufgebauten

- 5 Oligonukleotids dessen terminale OH-Gruppen mit labilen Schutzgruppen versehen sind, die gleich oder verschieden sein können, mit einer Markierungsverbindung, die einen Teil einer labilen Schutzgruppe nukleophil substituieren kann.

(Figur 1)

Figur 1

